



PATENT  
3658-0104P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Ingo MORANO et al. Conf.: 2355  
Appl. No.: 09/959,470 Group: UNASSIGNED  
Filed: December 21, 2001 Examiner: UNASSIGNED  
For: DIAGNOSTIC MARKER FOR THE HUMAN HEART

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

February 13, 2002

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
GERMANY	199 19 205.7	April 28, 1999

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By Mark J. Nuell  
Mark J. Nuell, #36,623

GMM/DRN/jms  
3658-0104P

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

Attachment

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



BSKR Oakes No.  
3658-104P  
Ser. No. 09/359,470  
filed Dec 21, 2001  
703-205-8000  
1 of 1

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 19 205.7

**Anmeldetag:** 28. April 1999

**Anmelder/Inhaber:** MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE  
MEDIZIN, Berlin/DE

**Bezeichnung:** Diagnostischer Marker für das Humanherz

**IPC:** G 01 N, C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Januar 2002  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt



Anmelder: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
Erfinder: Prof. I. Morano, Dr. H. Haase

## Diagnostischer Marker für das Humanherz

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen diagnostischen Marker für das Humanherz. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Wird das menschliche Herz überlastet, werden zelleigene Kompensationsmechanismen aktiviert, welche die Organfunktion aufrecht erhalten. Neben der Vergrößerung der Zelle (Hypertrophie) durch quantitative Steigerung der Proteinsynthese wird auch qualitativ durch Veränderung der Genexpression die Herzfunktion verbessert. Die meisten Patienten mit hypertrophierten Ventrikel reexprimieren die atriale leichte Myosinkette (ALC-1) (Schaub M.C. et al., (1984) Eur. Heart J. 5 (Suppl F) 85-93), was die Motorfunktion und damit die Leistungsfähigkeit des Myokard steigerte (Morano M. et al., (1996) J. Clin. Invest. 98: 467-473).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Methoden bereitzustellen, mit denen die ALC-1-Expression für diagnostische Zwecke ermittelt werden kann.

Es wurde gefunden, daß Patienten mit Herzhypertrophie, die ALC-1 reexprimierten, in ihrer Funktion deutlich verbessert waren (Abbildung 1).

Die ALC-1-Expression ist daher ein molekularer Marker für die Regenerationsfähigkeit des menschlichen Myokard. Die Analyse der ALC-1-Expression im Humanventrikel und die damit verbundenen Methoden (spezifischer Antikörper, Western-Blot bzw. Radioimmunoassay) als Marker für die Regenerations-

fähigkeit des Humanherzen sind daher Gegenstand der Erfindung. Das ist beispielsweise für die klinische Diagnostik von Bedeutung, wenn entschieden werden soll, ob ein herzinsuffizienter Patient, der mittels eines mechanischen Assistdevice die Zeit zur Transplantation überbrückt, transplantiert werden muß, oder ob sich sein eigenes Herz während der mechanischen Entlastung von selbst erholt hat: Der linke Ventrikel des erhaltenen Herzen wird dann ALC-1 exprimieren, der Ventrikel, der nicht regenerierte, wird dann kein ALC-1 exprimieren.

Zur Realisierung der Erfindung wurde ein spezifischer Peptid-Antikörper produziert, der selektiv mit der ALC-1, nicht aber mit anderen leichten Myosinketten reagiert (Abbildung 2, Western-Blot). Er wurde mittels eines synthetischen Peptides der Sequenz PAPEAPKEPAFDPKS erzeugt, das der aminoterminalen Sequenz 29-43 der menschlichen ALC-1 (Kurabayashi M. et al., (1988) J. Biol. Chem. 263: 1390-1396) entspricht. Dieses Peptid wurde an Keyhole Limpet Hämocyanin gekoppelt und als Immungen Kaninchen injiziert. Die Antiseren wurden durch Affinitätschromatographie gereinigt. Mit dem Antikörper wurden im Westernblot 50 ng ALC-1 nachgewiesen, so daß selbst kleinste Biopsieproben analysiert werden können.

### Legende zu den Abbildungen:

#### Abbildung 1

Korrelation zwischen der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  (in mmHg/sek.) des linken Ventrikels in vivo und der Menge exprimierter ALC-1 im linken Ventrikel bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie. ALC-1 Protein ist in 1/4 der gesamten essentiellen leichten Myosinketten ausgedrückt. Die Korrelation war hochsignifikant ( $p < 0.001$ ).

#### Abbildung 2

Westen-Blot-Analyse mit Antikörper gegen humane ALC-1. Unterschiedliche Mengen (5-30  $\mu g$ ) Atrium- und Ventrikelgewebe wurden aufgetragen. Der Antikörper reagierte nur mit der ALC-1, nicht aber mit den leichten Myosinketten im Ventrikel, was die hohe Sensivität des Antikörpers belegt.

28.04.99

### Patentansprüche

1. Diagnostischer Marker für das Humanherz, enthaltend einen Peptid-Antikörper, der selektiv mit humanem ALC-1 reagiert.
2. Diagnostischer Marker nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß der enthaltene Peptid-Antikörper die Sequenz PAPEAPKEPAFDPKS (aminoternale Sequenz 29-43 des humanen ALC-1) erkennt.
3. Peptid der Sequenz PAPEAPKEPAFDPKS einschließlich seiner Punktmutanten.
4. Verfahren zur Herstellung des Peptid-Antikörpers nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das synthetische Peptid PAPEAPKEPAFDPKS mit Hämocyanin koppelt und als Immungen Kaninchen injiziert, die sich bildenden Antiseren gewinnt, die enthaltenen Peptid-Antikörper isoliert und mittels Affinitätschromatographie reinigt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen diagnostischen Marker für das Humanherz. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Methoden bereitzustellen, mit denen die ALC-1-Expression für diagnostische Zwecke ermittelt werden kann.

Zur Realisierung der Erfindung wurde ein spezifischer Peptid-Antikörper produziert, der selektiv mit der ALC-1, nicht aber mit anderen leichten Myosinketten reagiert. Er wurde mittels eines synthetischen Peptides der Sequenz PAPEAPKEPAFDPKS erzeugt, das der aminoterminalen Sequenz 29-43 der menschlichen ALC-1 entspricht.

# cardiac *in vivo* contractility and ALC-1

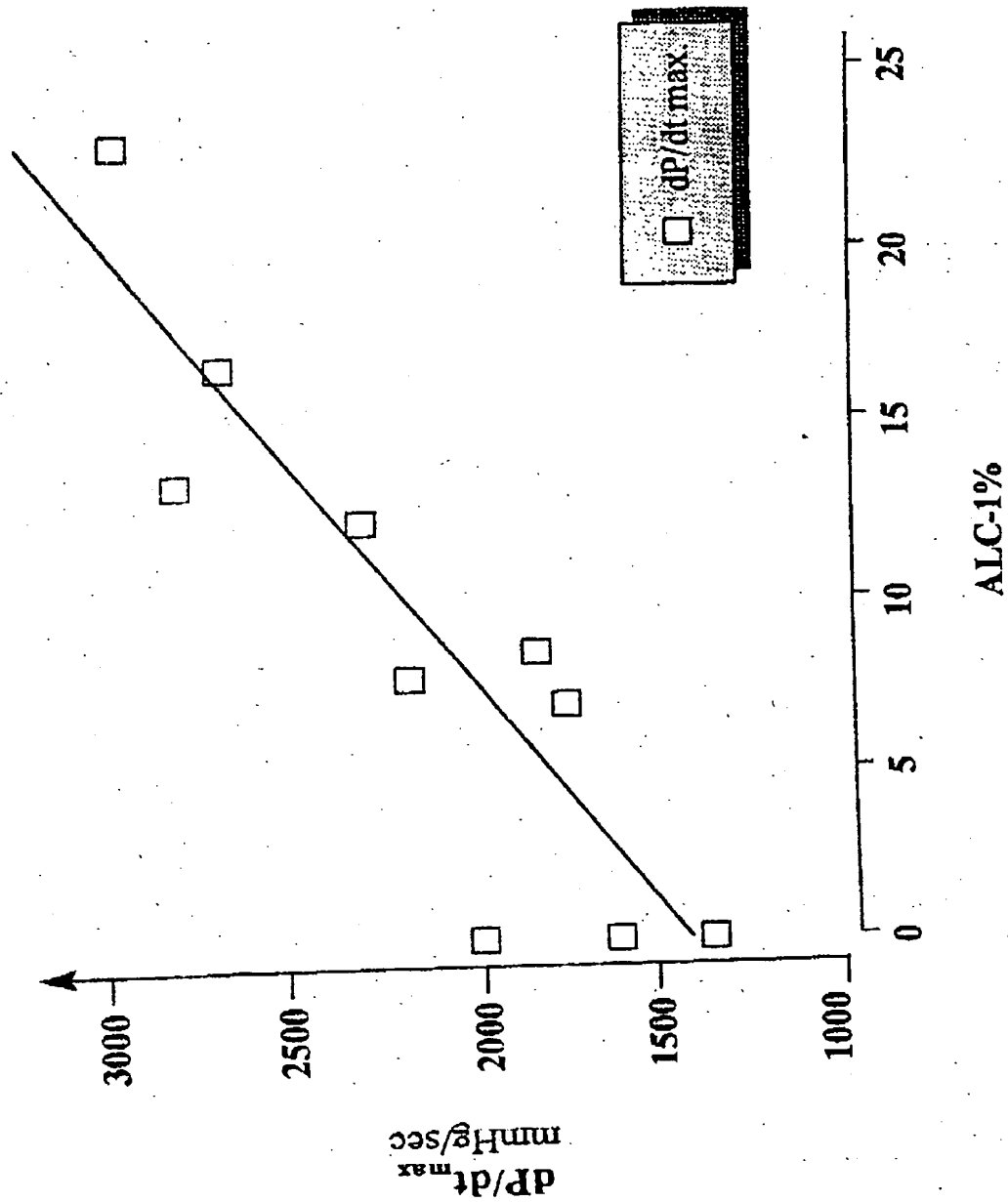


Abbildung 1



## Detection of ALC-1 in human heart

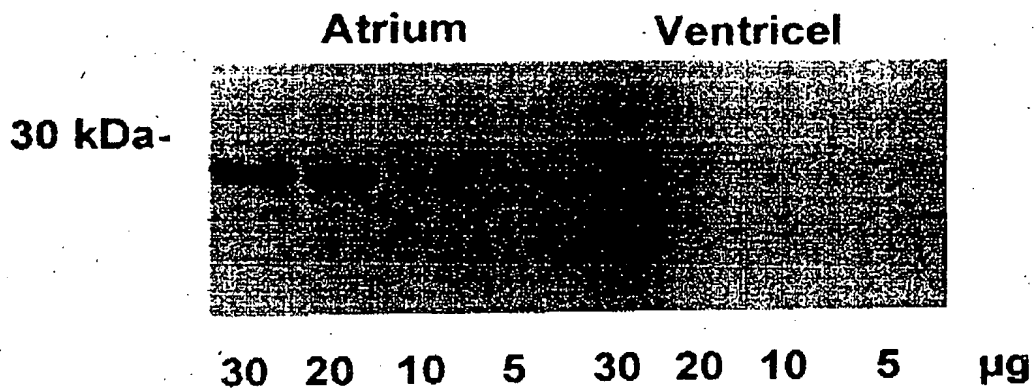


Abbildung 2